

## 明 細 書

## 癌診断方法

## 技術分野

本発明は、癌診断方法に関し、特に、早期に癌細胞の存在の有無を診断できる、癌診断方法に関する。

## 背景技術

日本において、毎年、新たに、300,000件の癌の症例が診断されている。

また、日本において、4人から5人に1人が、癌又は癌治療に関連した合併症で死亡している。このため、癌治療又は癌治療に関連した合併症の治療の改善に相当な努力が継続して行われている。

また、癌は早期に発見されると治癒率が高いことから、癌を早期に発見でき、精度の高い癌の診断方法の開発や改良が行われている。

即ち、大部分の癌患者は、その癌又は癌治療に関連した合併症腫瘍によっては死亡しない。癌患者の多くは、転移した癌、即ち、元の腫瘍細胞から分かれて、元の腫瘍細胞が存在している部位とは別の部位に移動する悪性細胞から形成される複数の腫瘍コロニーに負けるのである。

従って、患者の初期の腫瘍が発見・検出でき、そのような初期の腫瘍を、内科的切除術や、内科的抗がん治療、手術、放射線治療、抗がん剤による化学療法、及び、これらの組み合わせにより、縮小したり、除去できれば、患者は、癌を克服したり、延命することができる確立が非常に高くなる。

しかしながら、患者の腫瘍の早期発見・検出が困難であり、また、悪

性腫瘍を特徴づける、転移性コロニーは、その検出が困難であり、除去も困難である、という現状があり、臨床的観点から言えば、癌治療は困難なものとなっている、という現状がある。

ところで、癌の転移は、以下に示すような複雑な出来事を含む。

- 1) 最初の癌の発生位置から周囲組織への癌の拡張。
- 2) 体腔及び血管中への腫瘍細胞の浸透。
- 3) 循環系により腫瘍細胞が離れた部位への輸送・放出。
- 4) 滞留部位における腫瘍細胞の組織への再侵入。
- 5) 新たな部位における腫瘍細胞の生存と、腫瘍増殖をするための

血管形成等の新たな環境への適応。

即ち、腫瘍細胞は、初期の段階で、周囲組織に侵入し、組織バリアを破壊するので、腫瘍細胞は、固形腫瘍の発達の非常に初期段階（即ち、腫瘍が、 $10^4$ 個以上 $10^6$ 個以下の腫瘍細胞を含む時点）において、組織空間及び毛細血管中に侵入し、結局は、血液中に至るものと仮定される。この時点においては、腫瘍細胞の大部分は、アポトーシスや、免疫担当細胞により排除されたり、免疫担当細胞の殺傷機能により細胞死するか休眠状態となる。

これは、このような段階では、腫瘍細胞は、異所性環境において未だ生き残ることができず、また、成長することができないからである。

ところで、本発明者等の知る限り、このような初期段階の小さな腫瘍を検出する検出方法は未だ開発されていない。

現時点では、腫瘍がある程度大きくなった場合に、特定タイプの癌の診断に使用可能な高感度方法が開発されているに過ぎない。

そのような診断方法としては、例えば、乳房中の $2 \times 10^8$ 個の乳腫瘍細胞を検出できる、乳房撮影が開発されている。

乳癌の場合、その初期段階においては、腫瘍細胞の大部分の流出細胞

が死ぬとされている。しかしながら、腫瘍細胞が、 $10^6$ 個以上 $10^9$ 個まで増殖すると、何世代かにわたり、遺伝子的に不安定な腫瘍細胞のクローンは、更に、遺伝子レベルの変化を遂げ、より迅速に増殖する攻撃的な変異細胞を生じうる。そして、このような変異細胞は、二次腫瘍として生着する可能性が非常に高い。

しかしながら、上述したように、現状では、癌の診断は、初期段階では行えないため、例えば、脾臓、胃、卵巣、腎臓、肺、肝臓などの大部分の癌は、通常、 $10^{10}$ 個～ $10^{12}$ 個の腫瘍細胞が存在するような、癌の非常に後期の段階において行われており、この時点においては、腫瘍が既に周囲組織に侵入し、転移している可能性がある。

従来は、癌の初期段階における癌診断ができないこと、癌の根治治療が困難なこと、癌転移の複雑さ、化学療法に用いる薬剤の副作用の問題や、癌患者の治療に対する欲求不満を考慮して、治療方針を立て、癌の転移又は再発に対する治療効果をモニターするための診断試験の開発が行われてきた。

そして、最近20数年に亘る研究成果として、種々の診断試験方法が開発され、その有用性が評価されてきている。

より詳しく述べると、最初の試みとして、胎児の消化器で生産される胎児性のガン抗原と考えられていたが、結腸・直腸ガン、脾ガン、胆道系ガンなどの消化器ガンや、肺ガンなどの特定の腫瘍細胞上に出現する、癌胎児性抗原 (c a r c i n o e m b r y o n i c a n t i g e n ; C E A) に関するイムノアッセイの定式化がある。

その後、免疫化学的手法であるラジオイムノアッセイ法 (R I A) や、エンザイム・イムノアッセイ (E n z y m e - L i n k e d I m m u n o - S o r b e n t A s s a y (酵素免疫測定法 (E I A (又はE L I S Aとも称される。))) の出現により、C E Aを腫瘍マーカーとして

用いた R I A (ビーズ固相法) や、 $\alpha$ フエトプロテイン ( $\alpha$ -f e t o p r o t e i n ; A F P) を腫瘍マーカーとして用いた逆受身赤血球凝集反応 (R - P H A) や R I A (ビーズ固相法) や、前立腺特異性抗原をマーカーとして用いたエンザイム・イムノアッセイ (E I A) や R I A (ビーズ固相法) や、C A 1 5 - 3 を腫瘍マーカーとして用いた R I A (ビーズ固相法) や、C A 5 0 をマーカーとして用いたエンザイム・イムノアッセイ (E I A) や、C A 1 2 5 をマーカーとして用いた R I A (ビーズ固相法) や、P I V K A I I ([p r o t e i n i n d u c e d b y v i t a m i n e K a b s e n c e o r a n t a g o n i s t] I I) を用いたエンザイム・イムノアッセイ (E I A) などが多数開発されてきた。

しかしながら、これらの診断方法では、C E A、A F P、C A 1 5 - 3、C A 5 0、C A 1 2 5、P I V K A I I といった抗原は、通常、血中への出現が予想されず、検出された時には、既に、患者の癌が既に相当進行しており、既に、患者の生存の望みが殆どないので、これらの診断方法は、幾分、実りの無いものである、という評価を受けている。

しかしながら、最近 1 0 年間に於いて、ある一つの腫瘍マーカーが、癌の早期検出に有用であると期待され、その臨床応用に向けた研究開発が継続されてきた。

即ち、このある一つの腫瘍マーカーとは、「テロメレース (h T E R T)」である。

このテロメレース (h T E R T) は、9 0 % の癌腫で産生し且つ発現する悪性腫瘍特異的抗原 (酵素) であり、その活性が 1 9 9 4 年に発見されて以来 (K i m N W . S c i e n c e . 2 3 ; 2 6 6 : 2 0 1 1 - 2 0 1 5 ( 1 9 9 4) を参照)、その後、遺伝子の発見及び機能解析が行われてきたが、その特異性にも関わらず、臨床応用に関しては、腫瘍

形成、転移後の切除組織中からの検出に留まり、現行の臨床検査のように血液中から簡易に検出することができなかった。また、このテロメレーズ (h T E R T) は、たとえ、検出できても、混入しわずかに産生し発現している他の細胞 (リンパ球など) の影響が無視できず、定性的に検出することが正確にはできなかった。

2000年には、乳癌患者の血液からh T E R Tの定性的検出に関する報告がなされたが (Chen XQ. Clin Cancer Res. 6: 3823-3826 (2000))、感度が60%以下であり臨床応用にはほど遠かった (Kim NW. Science. 23; 266: 第2011頁~第2015頁 (1994)、Chen XQ. Clin Cancer Res. 6: 第3823頁~第3826頁 (2000) を参照。)

ところで、有用な診断試験をするためには、非常に高感度且つ信頼できる定量性が必要とされる。

また、血液1ml中における1個の腫瘍細胞の存在が検出できる血液試験が開発できれば、それは、平均して循環している全部で3000個~4000個の細胞に匹敵する。動物において、腫瘍を生着させるための接種実験において、実際にそのような数の細胞が腫瘍の生着を可能にする。さらに、3000個~4000個の循環細胞が腫瘍中の全細胞の0.01%である場合、全部で、約 $4 \times 10^7$ 個の細胞が含まれることになり、そのような数の細胞を含む腫瘍は、現在のいずれの方法によっても見ることはできない。

それゆえ、腫瘍細胞が癌の初期の段階において流出する場合、上記の感度を有する試験が開発できれば、その試験により、癌を検出することができる。

また、腫瘍細胞が腫瘍サイズといくらかの関連性を持って血液中に流

出する場合、腫瘍負荷を評価するための定量的試験は、有益である。

また、流出した腫瘍細胞と生体内の免疫細胞との闘いの末、腫瘍細胞や免疫担当細胞内の多種多様なDNAや蛋白質やRNAなどが血液中に流れ出る結果、RNAが検出されるとも考えられる。もしそうであれば、腫瘍特異的RNAの検出は、転移の最も早期での出来事を物語っているのかも知れない。しかしながら、従来は、非常に初期段階の循環腫瘍細胞の存在に関する情報がなかった。

上記のことより、二次腫瘍の確立の前に転移能を有する循環中の細胞を固定するための方法、特に癌の初期において同定する方法が渴望される。癌細胞の存在証拠を血液中から検出でき、正常細胞での発現レベルを認識でき、癌細胞由来のRNAを1～10コピーレベルの高感度で検出できることは、臨床上、極めて有用な情報を提供することになる。

機器開発の向上に伴い、癌組織の定量化が可能になったことを受けて、そのような高感度な定量法が可能となる時代に入ってきたことで、各種癌細胞由来RNAの定量化の実現の準備は技術的にも整っていると考えられる。

本発明は、上記した問題を解決するためになされたものであって、特に、癌の初期において癌細胞の存在証拠を血液中から検出できる、癌診断方法を提供することを目的としている。

#### 発明の開示

請求の範囲第1項に記載の癌診断方法は、体液中から体細胞・癌細胞成分として、RNAのみを含む試料を得る工程と、RNAを含む試料から逆転写酵素でcDNAを生成する逆転写酵素反応と蛍光色素を用いたPCRを、プライマーとして、hTERTでは、CGGAAGAGTGTC TGGAGCAAとGGATGAAGCGGAGTCTGGAを用

いて行い、PCRにより増幅されたPCR産物をPCR産物と結合した蛍光色素を用い、定量的に計測する工程とを備える。

尚、本明細書で用いる用語、「体液」は、血液、リンパ液その他の体液を意味する。

請求の範囲第2項に記載の癌診断方法は、体液中から体細胞・癌細胞成分として、RNAのみを含む試料を得る工程と、RNAを含む試料から逆転写酵素でcDNAを生成する逆転写酵素反応と蛍光色素を用いたPCRを、プライマーとして、AFPでは、CCAGAAACTAGT CCTGGATGTとCGTGGTCAGTTTG CAGCATTを用いて行い、PCRにより増幅されたPCR産物をPCR産物と結合した蛍光色素を用い、定量的に計測する工程とを備える。

本発明に係る癌診断方法は、癌の初期において癌細胞の存在証拠を血液中から検出できるので、早期に医療行為によって癌細胞を根絶することが可能になる。

また、本発明に係る癌診断方法では、血液中からmRNAを含む試料を得るようにしたので、癌組織腫瘍形成、転移後の切除組織中からテロメラーゼ(hTERT)やAFPを検出するような場合に比べ、癌細胞の有無を正確に検出することができる。

また、PCRを行う際に使用するプライマーを工夫することで、癌の初期において癌細胞の存在証拠を血液中から検出できる。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、PCR法により、本手法で抽出されたRNA中にはTリンパ球分画(CD3、CD8、PCRにより増幅されたPCR産物をPCR産物と結合する蛍光色素を用い、定量的に計測する)しか検出できず、血球成分の除去を確認したことを示す図である。



第2図は、慢性肝疾患（肝炎および肝硬変）から肝ガン発ガンへ増悪するにつれて、多段階的にテロメレース遺伝子およびAFPの発現が検出されていることをコピー数で示しており、各病変間での統計学的有意差が数字で表の上部に示されている。散布図の左傍には95%信頼区間をエラーバーで示し、エラーバーに囲まれた四角は平均値を示している。

第3図は、本発明に係る遺伝子発現（hTERT mRNA）による癌診断方法が、従来の腫瘍マーカーより優れた方法であることを、健常者に対する肝ガン患者の統計学的有意差を用いて示している箱ヒゲ図である。

第4図は、臨床上の各検査項目や検査所見と、定量化した2つの遺伝子発現（hTERT mRNA及びAFP mRNA）を多変量解析した結果を示している図である。

第5図は、2つの遺伝子発現（hTERT mRNA及びAFP mRNA）の癌診断方法による定量化の感度と特異度を示しているROC曲線である。（ROC曲線は、Receiver operator characteristic curve analysisを示す。）

第6図は、慢性肝疾患から肝ガンへの過程と、従来の腫瘍マーカー（AFP、AFP-L3、DCP）による癌診断方法と、2つの遺伝子発現（hTERT mRNA及びAFP mRNA）による癌診断方法の定量値を含めた各臨床検査結果や検査所見との相関を多変量解析した結果を示す図である。

第7図は、肝ガンにおける従来の腫瘍マーカー（AFP、AFP-L3、DCP）と該方法で用いた2つの遺伝子発現（hTERT mRNA及びAFP mRNA）の結果を、慢性肝疾患から肝ガンへの過程で、感度および特異度について比較した図である。



### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明に係る癌診断方法の一例を更に詳しく説明する。

本発明に係る癌診断方法では、まず、被験者（患者）の血液を採取する。

次に、血液中からRNAを含む試料を得る。

この工程においては、血液中を循環しているRNAを、他の血液細胞の影響を極力受ける事のないように、選択的に抽出する必要がある。

この目的を達成するために、被験者（患者）から体液を採液してから、迅速に以下のように処理をする。

#### 1) 採血管にEDTAが混入していない場合

患者の同意の下に、採液により得られた体液（約1～2ml）を700～800xgで10分間、4℃で遠心分離し、上清を他のRNase freeのチューブに移し、それを1500xgで10分間、4℃で遠心分離し、上清を別のRNase freeのチューブに移し、最後に、1600～3000xgで10分間、4℃で遠心分離し、RNAを含む原試料として、直ぐに用いるか、使用まで-80℃に貯蔵する。

#### 2) 採血管にEDTAが混入している場合

上記1)と同様にして得られた体液を1500～1600xgで10分間、4℃で遠心分離し、上清を他のRNase freeのチューブに移し、15,000xg以上で10分間、4℃で遠心分離し、その上清を0.22micrometerのフィルターで濾過して、RNAを含む原試料として、直ぐに用いるか、使用まで-80℃に貯蔵する。

次に、RNAを含む試料を、プライマーとして、hTERTのときは、CGGAAGAGTGCTGGAGCAAとGGATGAAGCGGAGTCTGGAを用い、PCRを行い、PCRにより増幅されたPCR産物をPCR産物と結合する蛍光色素を用い、定量的に計測する。尚、

A F P では、プライマーとして、C C A G A A A C T A G T C C T G G A T G T と C G T G G T C A G T T T G C A G C A T T を用い、P C R を行い、P C R により増幅された P C R 産物を P C R 産物と結合する蛍光色素を用い、定量的に計測する。

より詳しく説明すると、上記 1) 又は 2) により調製した、R N A を含む試料液 1 0 0 マイクロリットル ( $\mu$  l) に対し 1 7 5 マイクロリットル ( $\mu$  l) の希釈緩衝液 (d i l u t i o n b u f f e r)、l y s i s b u f f e r (S V t o t a l R N A i s o l a t i o n s y s t e m)、または、T R I z o l 試薬を用いて、その後、D N a s e 処理を含んだ R N A 抽出をマニュアル (この例では、S V t o t a l R N A i s o l a t i o n s y s t e m のマニュアル) に従って執り行う。

2 回の溶出により得られた R N a s e f r e e w a t e r 2 0 0 m i c r o l i t e r 中の R N A を、2 0 m i c r o l i t e r を R T - P C R 反応に用いるか、1 0 m i c r o l i t e r 相当の溶媒になるように調製し、その 1 マイクロリットル ( $\mu$  l) を R T - P C R 反応に用いる。

次いで、ワンステップで定量化するために、R N A から逆転写酵素で c D N A を生成する逆転写酵素反応と蛍光色素 (この例では、S Y B R G r e e n 1、ロッシュ (R o c h e) 社製を用いている。) を用いた定量的 P C R 法をシングルチューブで行う。

より詳細に説明すると、総反応液量 2 5 マイクロリットル ( $\mu$  l) に対し、1 マイクロリットル ( $\mu$  l) 以上 2 マイクロリットル ( $\mu$  l) の蛍光色素 (この例では、S Y B R G r e e n 1、ロッシュ (R o c h e) 社製を用いている。) を用い、マニュアル (この例では、O n e S t e p p R T - P C R k i t (Q I A G E N) のマニュアル) に従って反応液

を調製し、定量計測器（例えば、Light Cycler（ロッシュ（Roche）社製）にセットして、マニュアル（この例では、One Step RT-PCR kit（QIAGEN）のマニュアル）の指示通りに作動させ、原試料中のRNAの発現量を定量化する。

その際、反応条件として、1)逆転写反応を50℃で30分、2)反応活性化段階として、95℃で15分、その後、3)3ステップのPCR反応を55サイクル程度行う。アニーリング温度はプライマーに依存する。例えば、プライマーとして、hTERTでは、CGGAAGAGTGTCCTGGAGCAAとGGATGAAGCGGAGTCTGGAを用い、AFPでは、CCAGAAACTAGTCCTGGATGTとCGTGGTCAGTTTGCAGCATTを用いる。得られた計測数は、各腫瘍に応じて統計処理された最適カットオフ値（ガンの種類によっては特異性を高めるために複数のマーカーのカットオフ値を用いる。）と比較分析され、採血された患者における、目的とする癌細胞の有無を判定する。

次に、試験結果を説明する。

第1図は、PCR法により、本発明に係る癌診断方法で抽出されたRNA中には、Tリンパ球分画（CD3、CD8、PCRにより増幅されたPCR産物をPCR産物と結合する蛍光色素を用い、定量的に計測する。）しか検出できず、血球成分の除去を確認したことを示す図である。

第1図より明らかなように、本発明者は、本発明に係る癌診断方法にとって重要な肯定である、血球細胞除去は、血球細胞マーカーであるCD3、CD8、CD19、CD22、CD45、CD68のmRNAなどで確認した。

第2図は、肝疾患（肝炎および肝硬変）から肝ガン発ガンへ増悪するにつれて、多段階的にテロメラーゼ遺伝子およびAFPの発現が検出されていることをコピー数で示しており、各病変間での統計学的有意差が

数字で表の上部に示されている。散布図の左傍には 95% 信頼区間をエラーバーで示し、エラーバーに囲まれた四角は平均値を示している。

また、第 3 図は、本発明に係る癌診断方法が、従来の腫瘍マーカーによる癌診断方法よりも優れた方法であることを、健常者に対する肝ガン患者の統計学的有意差を用いて示している箱ヒゲ図である。

第 2 図及び第 3 図の結果から、本発明に係る癌診断方法では、肝病変の進行および増悪につれて、h T E R T m R N A の発現は多段階的に高まっていることが、明らかになった。

第 4 図は、臨床上の各検査項目や検査所見と、定量化した 2 つの遺伝子発現 (h T E R T m R N A 及び A F P m R N A) を多変量解析した結果を示している図である。

第 4 図から、臨床上の検査項目 (肝機能についての生化学的検査やウイルス量などの血清学的検査)、検査所見 (腫瘍径、腫瘍数、腫瘍の分化度) との多変量解析による比較により、特に、h T E R T m R N A の発現は、発ガンということに関しては腫瘍径、腫瘍数、腫瘍の分化度との強い相関があることが、明らかになった。

第 5 図は、2 つの遺伝子発現 (h T E R T m R N A 及び A F P m R N A) による癌診断方法による定量化の感度と特異度を示している R O C 曲線である。尚、R O C 曲線は、R e c e i v e r o p e r a t o r c h a r a c t e r i s t i c c u r v e a n a l y s i s を示す。

第 5 図から明らかなように、ガン死亡率第 4 位である肝ガンにおいて、本発明に係る遺伝子発現 (h T E R T m R N A) による癌診断方法は、感度が 88.2% であり、特異度が 68.7% であった。

一方、遺伝子発現 (A F P m R N A) による癌診断方法は、感度が 70.1% であり、特異度が 65.8% であった。

また、肝ガンの発ガン過程 (ほとんどの肝発ガンはウイルス性慢性肝

疾患から発ガンであり、健常者を除いて統計処理する場合)で、本発明に係る遺伝子発現(h T E R T m R N A)による癌診断方法の感度は、85.9%であり、また、特異度は、70.0%であり、他の腫瘍マーカーに劣るものではなかった。

第6図は、慢性肝疾患から肝ガンへの過程と、従来の腫瘍マーカー(A F P、A F P - L 3、D C P)と、2つの遺伝子発現(h T E R T m R N A及びA F P m R N A)による癌診断方法の定量値を含めた各臨床検査結果や検査所見との相関を多変量解析した結果を示す図である。

また、第7図は、肝ガンにおける従来の腫瘍マーカー(A F P、A F P - L 3、D C P)による癌診断方法と、2つの遺伝子発現(h T E R T m R N A及びA F P m R N A)による癌診断方法の結果を、慢性肝疾患から肝ガンへの過程で、感度および特異度について比較した図である。

第6図及び第7図から、肝ガンの腫瘍マーカーの一つであり、最も実績が高かったアルファフェトプロテイン(A F P)を2つの遺伝子発現(h T E R T m R N A及びA F P m R N A)による癌診断方法で検出したところ、本発明に係る遺伝子発現(h T E R T m R N A)による癌診断方法の方が、従来の遺伝子発現(A F P)による癌診断方法(感度69.3%、特異度60.0%)よりも高い感度(感度85.9%、特異度70.0%)を示すことが、明らかになった。

また、本発明に係る遺伝子発現(A F P m R N A)による癌診断方法の方が、従来の遺伝子発現(A F P)による癌診断方法(感度69.3%、特異度60.0%)よりも高い感度(感度71.6%、特異度67.5%)を示すことが、明らかになった。

このことから、本発明に係る遺伝子発現(h T E R T m R N A)による癌診断方法が、転移性の悪性腫瘍全般にわたり、有効であると考えら

れた。更に、本発明に係る遺伝子発現（h T E R T m R N A）による癌診断方法を基礎として、体液中 R N A によるガン細胞存在診断が、健診レベルでもスクリーニングが可能になり、一人でも多くの患者が早期発見及び再発発見により、その生命予後が著しく改善されうると考える。

また、本発明に係る遺伝子発現（A F P m R N A）による癌診断方法を基礎として、体液中 R N A によるガン細胞存在診断が、健診レベルでもスクリーニングが可能になり、一人でも多くの患者が早期発見及び再発発見により、その生命予後が著しく改善されうると考える。

尚、本明細書の、発明を実施するための最良の形態では、本発明に係る癌診断方法として、血液中から R N A を抽出した例を示したが、本発明に係る癌診断方法では、血液から R N A を抽出する場合に限られず、血液以外の体液から R N A を抽出するようにしてもよい。

#### 産業上の利用可能性

以上のように、本発明に係る癌診断方法は、癌の初期において癌細胞の存在証拠を血液中から検出できるので、早期に医療行為によって癌細胞を根絶することが可能になる。

また、血液中から m R N A を含む試料を得るようにしたので、癌組織腫瘍形成、転移後の切除組織中からテロメラーゼ（h T E R T）や A F P を検出するような場合に比べ、癌細胞の有無を正確に検出することができる。

また、P C R を行う際に使用するプライマーを工夫することにより、癌の初期において癌細胞の存在証拠を血液中から検出できる。

本発明に係る癌診断方法は、医療分野において利用する価値が高い。

## 請 求 の 範 囲

1. 体液中から、体細胞・癌細胞成分として、RNAのみを含む試料を得る工程と、

前記RNAのみを含む試料から逆転写酵素でcDNAを生成する逆転写酵素反応と蛍光色素を用いたPCRを、プライマーとして、hTERTでは、CGGAAGAGTGTC TGGAGCAAとGGATGAAGCGGAAGTCTGGAを用いて行い、前記PCRにより増幅されたPCR産物を前記PCR産物と結合した蛍光色素を用い、定量的に計測する工程とを備える、癌診断方法。

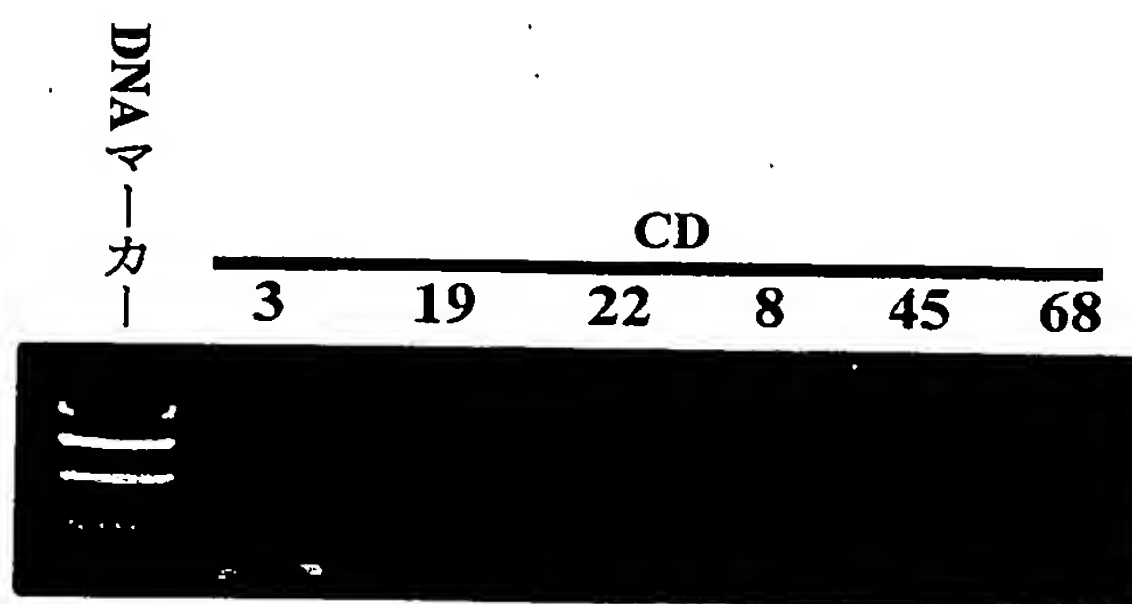
2. 体液中から、体細胞・癌細胞成分として、RNAのみを含む試料を得る工程と、

前記RNAのみを含む試料から逆転写酵素でcDNAを生成する逆転写酵素反応と蛍光色素を用いたPCRを、プライマーとして、AFPでは、CCAGAAACTAGTCTTGGATGTとCGTGGTCAGT TTGCAGCAT Tを用いて行い、前記PCRにより増幅されたPCR産物を前記PCR産物と結合した蛍光色素を用い、定量的に計測する工程とを備える、癌診断方法。



1/7

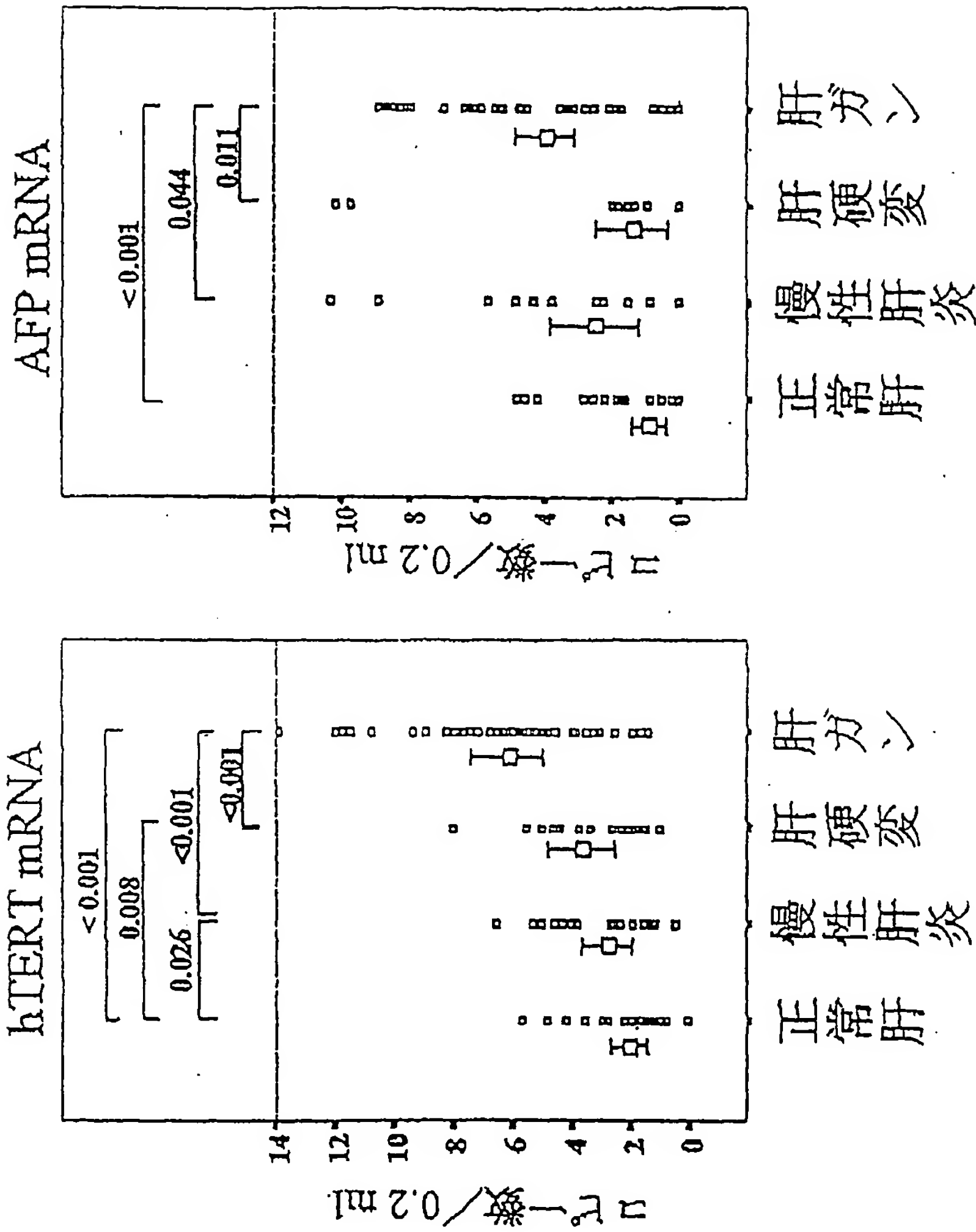
第1図



BEST AVAILABLE COPY

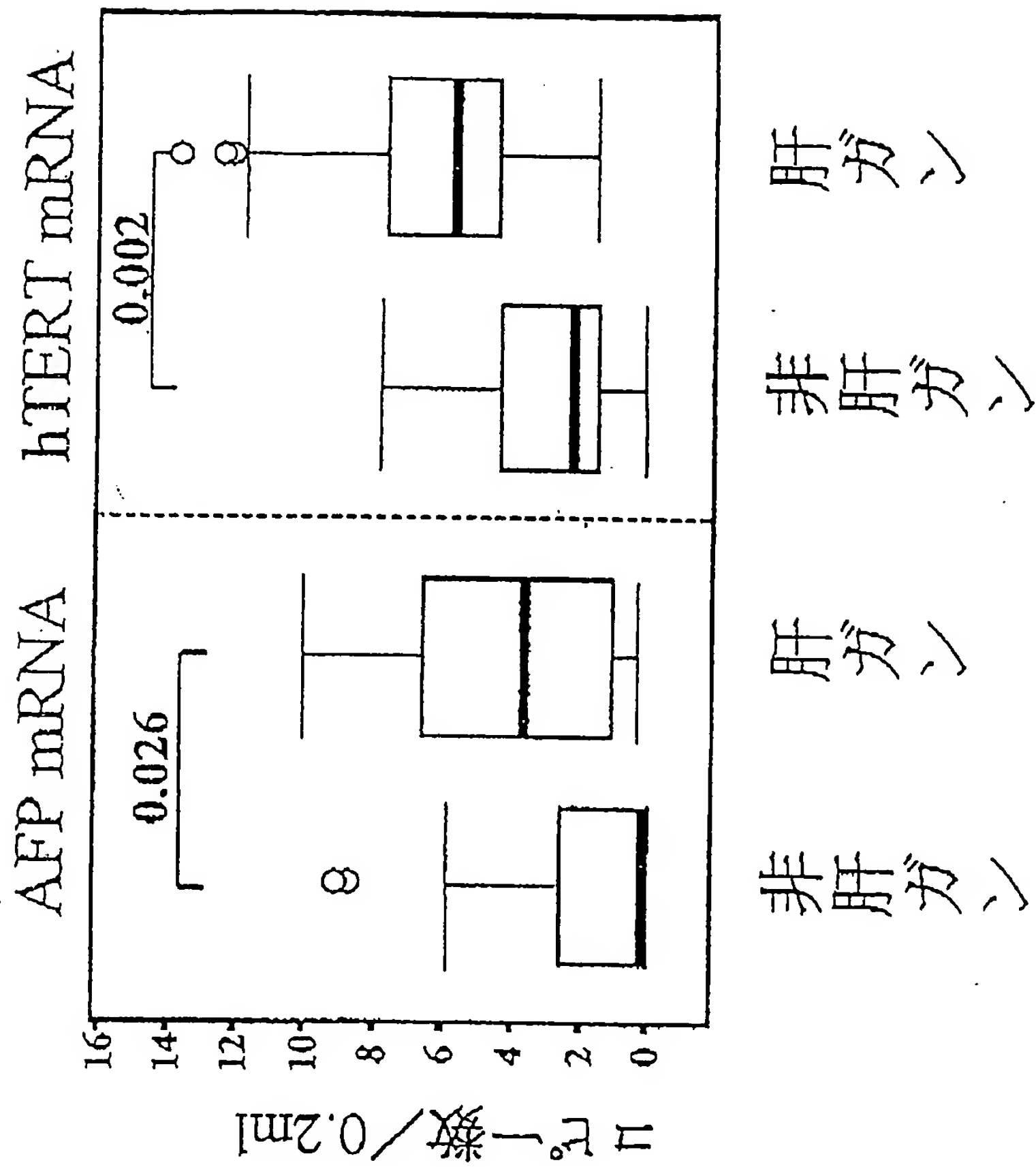
2/7

第2図



3/7

第3図

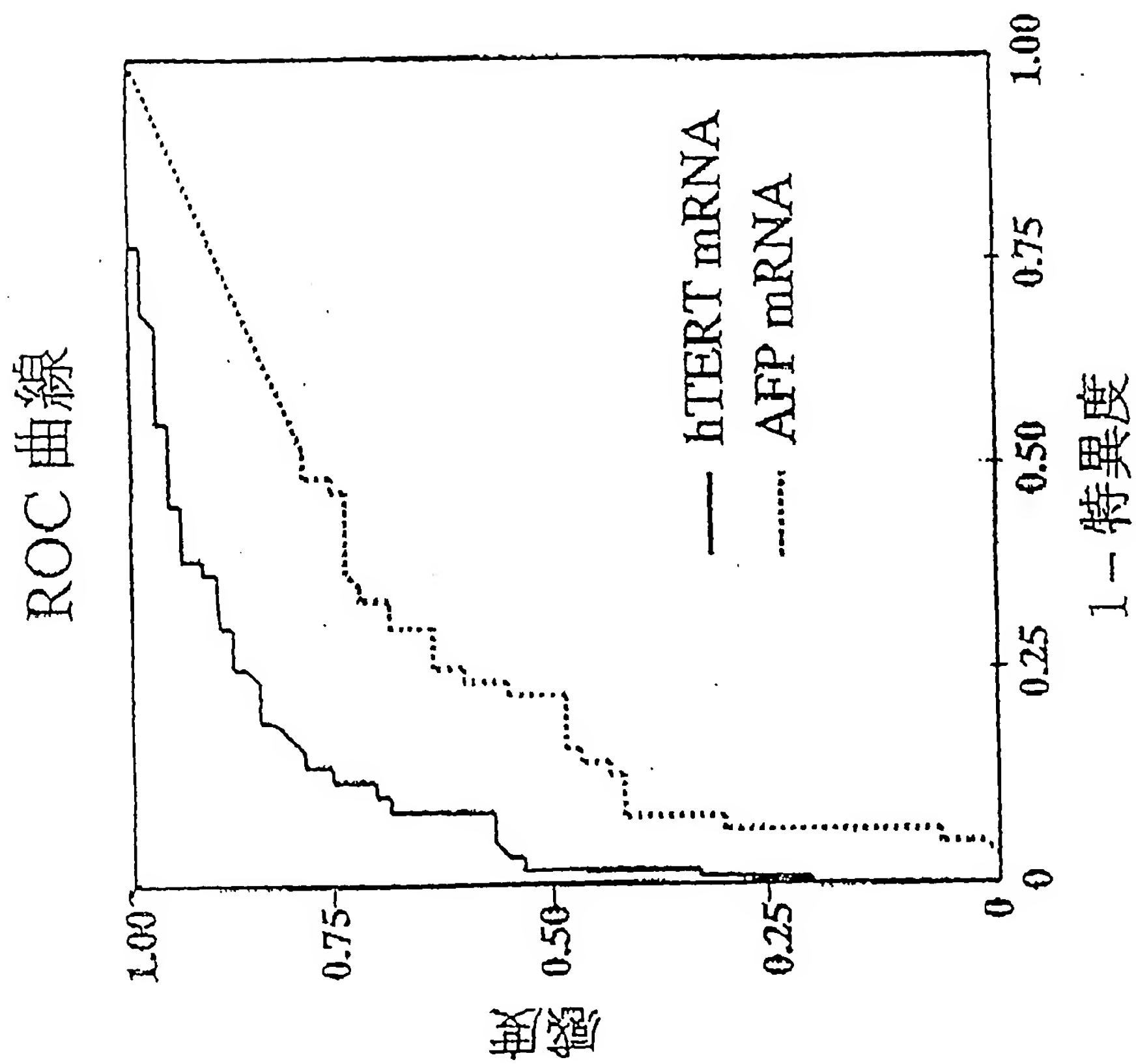


第4図

臨床マーカー		多変量解析	
		hTERT mRNA	AFP mRNA
		p値	p値
年齢	平均59歳 (22から83まで)		
性	男 72	0.008	0.798
	女 52	0.761	0.089
病因	B型ウイルス 21		
	C型ウイルス 51		
	B+C型ウイルス 3	0.250	0.651
	非B非C 2		
	アルコール 3		
非ガン部			
	正常 31		
	原発性胆汁性肝硬変 2	0.060	0.973
	慢性肝炎 29		
	肝硬変 62		
アルブミン (g/dl)		0.018	0.340
総ビリルビン (mg/dl)		0.928	0.693
ALT (IU/l)		0.538	0.149
Child分類	A 21	0.136	0.573
	B 43		
	C 5		
AFP (ng/ul)		0.811	0.319
AFP-L3 (%)		0.123	0.425
DCP (mAU/ml)		0.854	0.651
腫瘍径	2cm> 18	<0.001	0.061
	2~3 cm 26		
	3 cm< 10		
腫瘍数	1 10		
	2 22	<0.001	0.123
	3≦ 22		
腫瘍の分化度	腺腫瘍過形成 3		
	高分化 28	0.010	0.096
	中分化 22		
	低分化 1		

5/7

第5図



6/7  
第6図

慢性肝炎 肝硬変 → 肝ガン 肝硬変 → 肝ガン			
		(n=40)	(n=54)
腫瘍マーカー			
AFP	0.376	0.532	
AFP-L3	0.144	0.228	
DCP	0.317	0.479	
AFP mRNA	0.001	0.001	
bTERT mRNA	<0.001	<0.001	
生化学検査所見			
Alb	<0.001	0.040	
ALT	0.018	0.031	
Child-Pugh	0.001	0.095	

第7図

肝ガン腫瘍マーカーにおける感度と1-特異度			
	感度	1-特異度	p 値
AFP	0.693	0.400	0.002
AFP-L3	0.563	0.075	0.304
DCP	0.815	0.365	<0.001
AFP mRNA	0.716	0.325	<0.001
hTERT mRNA	0.859	0.300	<0.001



1/1

## SEQUENCE LISTING

HAIRETSU

<110> Miura, Norimasa  
Shiota, Goshi

<120> Method for cancer diagnosis

<130> PMUR-697

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of upstream primer for hTERT

<400> 1

cggaagagtg tctggagcaa 20

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of downstream primer for hTERT

<400> 2

ggatgaagcg gagtctgga 19

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of upstream primer for AFP

<400> 3

ccagaaacta gtcctggatg t 21

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of downstream primer for AFP

<400> 4

cgtggtcagt ttgcagcatt 20

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017542

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/68, C12N15/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/00-70, C12N15/00-90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
JICST FILE (JOIS), PubMed/BIOSIS/WPI (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	X.Chen et al., Telomerase RNA as a Detection Marker in Serum of Breast Cancer Patients, Clinical Cancer Research, 2000, 6, pages 3823 to 3826	1
X	N. Funaki et al., QUANTITATIVE ANALYSIS OF ALPHA-FETOPROTEIN mRNA IN CIRCULATING PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH HEPATOCELLULAR AND ALPHA-FETPROTEIN-PRODUCING GASTRIC CARCINOMAS, Life Science, 1998, 62(21), pages 1973 to 1984	2
X	Shin TAKEDA et al., "Gan no Bunshi Shindangaku - Kokomade Susunda Shindan Chiryo eno Oyo - 5. Kangan ni okeru Idenshi Shindan no Genjo", Nichigai Kaishi, 2002, 103(6), pages 472 to 475	2

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
07 February, 2005 (07.02.05)

Date of mailing of the international search report  
22 February, 2005 (22.02.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017542

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	S.Kyo et al., HUMAN TELOMERASE REVERSE TRANSCRIPTASE AS A CRITICAL DETERMINANT OF TELOMERASE ACTIVITY IN NORMAL AND MALIGNANT ENDOMETRIAL TISSUES, Int.J.Cancer, 1999, 80, pages 60 to 63	1
A	M.Takakura et al., Expression of Human Telomerase Subunits and Correlation with Telomerase Activity in Cervical Cancer, CANCER RESEARCH, 1998, 58, pages 1558 to 1561	1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017542

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1 and 2, specifically parts thereof

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 1 and 2 pertain to diagnostic methods to be practiced on the human body and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☒ Claims Nos.: 1 and 2, specifically parts thereof

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Whether the invention of claims 1 and 2 is directed to a method of detecting cancer or method of diagnosing cancer from a blood sample in accordance with the RT-PCR method is unclear. With respect to the unclear description, search has been carried out interpreting it as meaning the "method of detecting cancer".

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The technical matter common to claim 1 and claim 2 is a method of detecting a tumor marker gene through performing of RT-PCR with respect to an RNA sample obtained from a body fluid. However, this common matter is publicly known as described in, for example, the following literature. Therefore, claim 1 and claim 2 cannot be stated as sharing a special technical feature, so that this invention group cannot be stated as being a group of inventions linked with each other so as to form a single general inventive concept.

Clinical Cancer Research. 2000 Oct;6:3823-3826.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017542

Claims 1 and 2

Whether the invention of these claims is directed to a method of detecting cancer or method of diagnosing cancer from a blood sample in accordance with the RT-PCR method is unclear.

With respect to the unclear description, search has been carried out interpreting it as meaning the "method of detecting cancer".

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2004/017542

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int Cl<sup>7</sup> C12Q1/68, C12N15/09

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int Cl<sup>7</sup> C12Q1/00-70, C12N15/00-90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
JICSTファイル(JOIS)、PubMed/BIOSIS/WPI (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	X.Chen, et. al, Telomerase RNA as a Detection Marker in Serum of Breast Cancer Patients, Clinical Cancer Research, 2000, 6, p.3823-3826	1
X	N.Funaki, et. al, QUANTITATIVE ANALYSIS OF ALPHA-FETOPROTEIN mRNA IN CIRCULATING PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH HEPATOCELLULAR AND ALPHA-FETPROTEIN-PRODUCING GASTRIC CARCINOMAS, Life Science, 1998, 62(21), p.1973-1984	2
X	竹田伸 他, 癌の分子診断学—ここまで進んだ診断・治療への応用— 5. 肝臓における遺伝子診断の現状;	2

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.02.2005

国際調査報告の発送日

22.2.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
阪野 誠司

4N

3434

電話番号 03-3581-1101 内線 3447

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	日外会誌, 2002, 103(6), p. 472-475 S. Kyo, et. al, HUMAN TELOMERASE REVERSE TRANSCRIPTASE AS A CRITICAL DETERMINANT OF TELOMERASE ACTIVITY IN NORMAL AND MALIGNANT ENDOMETRIAL TISSUES, Int. J. Cancer, 1999, 80, p. 60-63	1
A	M. Takakura, et. al, Expression of Human Telomerase Subunits and Correlation with Telomerase Activity in Cervical Cancer, CANCER RESEARCH, 1998, 58, p. 1558-1561	1



法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 1、2 の一部 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、  
請求の範囲 1 及び 2 は、人体の診断方法に関するものであって、PCT 第 17 条(2)(a) (i) 及び PCT 規則 39.1 (iv) の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☒ 請求の範囲 1、2 の一部 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
請求の範囲 1 及び 2 に係る発明は、血液サンプルから R T - P C R 法により癌を検出する方法であるのか、または、癌診断方法であるのか不明確である。  
なお、上記不明確な記載は、「癌を検出する方法」を意味すると解して調査を行った。
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1及び請求の範囲2は、体液中から得たRNAサンプルに対してRT-PCRを行ない腫瘍マーカー遺伝子を検出する方法を共通の技術的事項とするが、この共通事項については、例えば、以下の文献に示されているように公知である。よって、請求の範囲1及び請求の範囲2は、特別な技術的特徴を有しているとはいえず、これらの発明群は、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとはいえない。

Clinical Cancer Research. 2000 Oct;6:3823-3826.

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

請求の範囲 1、2

上記請求の範囲に係る発明は、血液サンプルからRT-PCR法により癌を検出する方法であるのか、または、癌診断方法であるのか不明確である。

なお、上記不明確な記載は、「癌を検出する方法」を意味すると解して調査を行った。